

Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor.

III. Mortalidade, pesos corporal e das vísceras*

Relationship between the pathogenicity of Schistosoma mansoni in mice and the susceptibility of the vector mollusc. III. Mortality, body weight and viscera weights

Eliana Maria Zanotti-Magalhães, Luiz Augusto Magalhães,
José Ferreira de Carvalho

Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas, SP - Brasil - (E. M. Z. M., L. A. M.),
Departamento de Estatística do Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas, SP - Brasil - (J. F. C.)

Estudou-se a relação entre o desenvolvimento da hepatomegalia, da esplenomegalia, peso corporal e taxa de mortalidade em camundongos experimentalmente infectados por *Schistosoma mansoni* com o grau de susceptibilidade de *Biomphalaria glabrata* e *B. tenagophila* nas quais se desenvolveram as cercárias infectantes respectivamente, das linhagens BH e SJ. Foram utilizados como hospedeiro definitivo camundongos Swiss, SPF e como hospedeiros intermediários populações de moluscos selecionados geneticamente para o caráter susceptibilidade. Foram observados menores pesos corporais e das vísceras em camundongos infectados com cercárias provenientes de moluscos que apresentaram elevado grau de susceptibilidade. A maior susceptibilidade dos moluscos à infecção pelo *S. mansoni* correspondeu a uma menor sobrevivência dos camundongos infectados. Os resultados fazem crer que a maior adaptação do parasita ao hospedeiro intermediário, traduzidos pelas taxas mais elevadas de susceptibilidade, pode levar a um comportamento diferente deste parasita no hospedeiro definitivo.

Biomphalaria, parasitologia. Schistosoma mansoni, patogenicidade. Hepatomegalia, epidemiologia. Esplenomegalia, epidemiologia.

Introdução

Uma das principais manifestações clínicas da esquistossomose mansônica é o desenvolvimento da hepatosplenomegalia.

A hepatosplenomegalia é avaliada em trabalhos experimentais, com animais, através do peso do fígado e do baço. Se nessa importante manifestação clínica está envolvida a característica genética do hospedeiro vertebrado, o estágio de desenvolvimento da doença e a linhagem do parasita deverão também ser fatores a serem considerados (Warren¹⁶, 1967).

A observação de indivíduos que desenvolvem hepatosplenomegalia compensada nas áreas

endêmicas abrangidas pela linhagem SJ do *S. mansoni* é rara (Santos¹⁴, 1967; Lima⁹, 1991), enquanto em áreas dominadas pela linhagem BH se observam indivíduos com hepatosplenomegalia descompensada.

No presente trabalho procurou-se verificar a existência de relação entre o desenvolvimento de hepatosplenomegalia com a suscetibilidade do molusco vetor que produziu as cercárias infectantes para o hospedeiro vertebrado. Observou-se também a mortalidade dos camundongos e seu peso corporal.

Material e Método

Moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* foram selecionados geneticamente por processo de

*Pesquisa financiada pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) - Processo nº 43.810417-0 e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Processo nº 40.0798.85

Separatas/Reprints: Eliana Maria Zanotti-Magalhães - Cidade Universitária - Barão Geraldo - Caixa Postal 6109 - 13083-970 - Campinas, SP - Brasil - Fax: (0192) 39-3124

Edição subvencionada pela FAPESP. Processo 95/2290-6.

Recebido em 18.1.1995. Aprovado em 31.5.1995

autofecundação, para o caráter susceptibilidade. Obtiveram-se dessa forma, para cada espécie, 5 progenies de moluscos, que foram expostos a 10 miracídeos das linhagens BH e SJ, respectivamente.

As cercárias obtidas de cada espécie de molusco e sua prole foram utilizadas para infecção de camundongos Swiss, SPF, formando-se os seguintes grupos:

Camundongos infectados com a linhagem BH:

- 20 camundongos infectados com cercárias da geração parental (BHP).
- 19 camundongos infectados com cercárias da geração F₁ (BHF₁).
- 20 camundongos infectados com cercárias da geração F₂ (BHF₂).
- 27 camundongos infectados com cercárias da geração F₃ (BHF₃).
- 25 camundongos infectados com cercárias da geração F₄ (BHF₄).

Camundongos infectados com a linhagem SJ:

- 14 camundongos infectados com cercárias da geração parental (SJP).
- 18 camundongos infectados com cercárias da geração F₁ (SJF₁).
- 19 camundongos infectados com cercárias da geração F₂ (SJF₂).
- 18 camundongos infectados com cercárias da geração F₃ (SJF₃).
- 10 camundongos infectados com cercárias da geração F₄ (SJF₄).

Os subgrupos de camundongos foram constituídos à medida em que as cercárias foram sendo eliminadas pelos caramujos.

Os roedores foram infectados imergindo-se suas caudas em tubo de ensaio contendo suspensão cercariana. Cada animal foi exposto a 100 cercárias.

Um terceiro grupo de camundongos foi constituído, denominado grupo controle, sem infecção por *S. mansoni*.

Ao fim de oito semanas, os roedores sobreviventes foram sacrificados. Por essa ocasião, foram

registrados: peso corporal final, peso do fígado e peso do baço. O peso corporal inicial foi anotado por ocasião da infecção.

Os métodos de análise estatística dos dados utilizaram os procedimentos usuais de análise de variância. Procedeu-se, também, ao estudo dos efeitos de linhagem e de taxa de infecção dos moluscos em cada resposta. Os cálculos foram feitos com o software SAS®, em computador compatível com IBM-PC.

Resultados

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados referentes às taxas de infecção das gerações P, F₁, F₂, F₃ e F₄ de *B. glabrata* e *B. tenagophila* expostas às respectivas gerações de *S. mansoni*. A partir da geração F₁ observou-se acentuado aumento da susceptibilidade dos moluscos.

A taxa de mortalidade referente aos camundongos do grupo controle e do grupo infectado com as linhagens BH e SJ de *S. mansoni* está apresentada na Tabela 2.

O estudo estatístico realizado considerou os resultados dos camundongos infectados desde que não tenham ocorrido mortes no grupo de camundongos não submetidos à infecção pelo *S. mansoni*.

Através da Tabela 3, verifica-se que a taxa de infecção dos moluscos foi parâmetro significativo ($p < 4\%$) na morte dos camundongos. Foi observado que a taxa de mortalidade apresentada por camundongos infectados com a geração parental do parasita foi menor e significativamente diferente da taxa de mortalidade observada nos grupos de camundongos infectados com *S. mansoni* das gerações F₁, F₂, F₃ e F₄.

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentadas as médias referentes aos pesos corporal e das vísceras dos camundongos infectados por cercárias de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ, provenientes de moluscos das gerações P, F₁, F₂, F₃ e F₄. Constam também desta tabela, os resultados referentes ao grupo de

Tabela 1 - Taxa de infecção das gerações de *B. glabrata* e *B. tenagophila* submetidas à infecção pelas correspondentes gerações de *S. mansoni*, respectivamente das gerações BH e SJ.

Espécie	Geração dos moluscos e do <i>S. mansoni</i>	Nº de moluscos examinados	Nº de moluscos que eliminaram cercárias	Taxa de infecção (%)
<i>B. glabrata</i>	P	50	22	44
	F ₁	29	20	69
	F ₂	66	48	73
	F ₃	19	14	74
	F ₄	20	12	60
<i>B. tenagophila</i>	P	59	9	15
	F ₁	72	35	49
	F ₂	47	28	60
	F ₃	52	35	67
	F ₄	27	7	26

Tabela 2 - Taxa de mortalidade apresentada por camundongos infectados com *S. mansoni* das linhagens BH e SJ e por camundongos do grupo controle.

Grupos de camundongos	Geração do <i>S. mansoni</i>	Nº de camundongos experimentados	Nº de camundongos mortos	Taxa de mortalidade (%)
BH	P	20	3	15,0
	F ₁	19	7	36,8
	F ₂	20	10	50,0
	F ₃	27	9	33,3
	F ₄	25	15	60,0
SJ	P	14	2	14,3
	F ₁	18	4	22,2
	F ₂	19	8	42,1
	F ₃	18	9	50,0
	F ₄	10	2	20,0
Controle	-	10	0	0

Tabela 3 - Análise de variância considerando a mortalidade dos camundongos.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Qui-quadrado	Probabilidade
Intercepto	1	17,13	0,00
Linhagem	1	2,80	0,09
Taxa	8*	16,41	0,04

*O modelo é saturado e contém parâmetros redundantes, devido à estrutura de dados

Tabela 4 - Peso corporal médio de camundongos submetidos ou não à infecção por *S. mansoni*.

Grupos	Geração do <i>S. mansoni</i>	Peso corporal (g)	
		Inicial	Final
BH	P	18,85±0,85	29,13±2,36
	F ₁	17,61±0,70	25,25±4,26
	F ₂	17,24±0,78	20,02±2,92
	F ₃	17,42±0,92	22,20±3,58
	F ₄	17,01±0,83	23,83±4,45
SJ	P	18,27±0,96	26,39±2,00
	F ₁	17,33±0,86	22,94±4,78
	F ₂	17,48±0,84	21,30±2,54
	F ₃	17,22±0,96	22,04±2,56
	F ₄	17,95±0,84	25,83±2,04
Controle	-	18,30±1,27	29,25±3,23

Tabela 5 - Peso médio do fígado e do baço de camundongos submetidos ou não à infecção por *S. mansoni*.

Grupos	Geração do <i>S. mansoni</i>	Peso do Fígado (g)	Peso do Baço (g)
BH	P	2,7835±0,42	0,6077±0,17
	F ₁	2,1452±0,55	0,4110±0,15
	F ₂	1,6278±0,38	0,2765±0,09
	F ₃	2,1391±0,57	0,3717±0,15
	F ₄	2,3403±0,61	0,4860±0,18
SJ	P	2,1359±0,34	0,3809±0,12
	F ₁	1,9259±0,60	0,3313±0,16
	F ₂	1,6088±0,30	0,2931±0,10
	F ₃	1,6012±0,34	0,2859±0,17
	F ₄	2,2383±0,33	0,3816±0,17
Controle	-	1,5461±0,20	0,1889±0,04

Tabela 6 - Análise de variância (soma dos quadrados do tipo III) por respostas.

Resposta/Fonte de variação	Peso Corporal Final		Peso do Fígado		Peso do Baço	
	Valor	Nível P	Valor	Nível P	Valor	Nível P
<i>Linhagem</i>						
Soma dos quadrados	243,9	0,0001	4,6	0,0001	0,6	0,0001
Graus de liberdade	1		1		1	
<i>Taxa (linhagem)</i>						
Soma dos quadrados	753,2	0,0001	10,1	0,0001	0,9	0,0001
Graus de liberdade	2		2		2	
<i>Resíduo</i>						
Soma dos quadrados	1387,2		27,5		2,6	
Graus de liberdade	117		117		117	

camundongos não submetidos à infecção pelo *S. mansoni* (Grupo-controle).

A Tabela 6 contém os resultados da análise estatística com referência aos pesos corporal final e das vísceras. A média obtida para o peso corporal final no grupo-controle foi significativamente maior (a nível de 5%) do que as médias obtidas para as linhagens BH e SJ. Camundongos infectados com a linhagem BH apresentaram peso corporal final significativamente maiores do que camundongos infectados com a linhagem SJ.

A infecção por *S. mansoni* provocou aumento significativo no peso do fígado e do baço, sendo que camundongos infectados com a linhagem BH apresentaram um aumento maior do peso do fígado e do baço que camundongos infectados com a linhagem SJ.

A taxa de infecção apresentada pelos moluscos, nos quais se originaram as cercárias, que foram utilizadas na infecção dos camundongos, foi parâmetro significativo, verificando-se menores pesos corporal e das vísceras com o aumento da susceptibilidade dos caramujos.

Discussão e Conclusões

A verificação do peso do fígado e do baço dos camundongos infectados com *S. mansoni* é critério de avaliação do desenvolvimento da hepatomegalia e da esplenomegalia também, comumente observadas em pacientes humanos.

Warren¹⁶ (1967), estudando a esquistossomose em camundongos infectados com as linhagens de Porto Rico, Brasil, Egito e Tanzânia, verificou esplenomegalia significativa mesmo nos animais

infectados com um par de vermes. A hepatomegalia foi observada em todos os animais, exceto naqueles infectados com a linhagem egípcia. As linhagens brasileira e portorriquenha induziram maior aumento do fígado, que foi acompanhado, no caso da linhagem brasileira, por fibrose acentuada. A linhagem egípcia induziu aumento menor do fígado, apresentando também menores granulomas. Em estudo quantitativo, realizado através de autópsias de indivíduos infectados, Cheever⁴ (1968) verificou que, mesmo quando os pesos do fígado e do baço não estavam aumentados, a fibrose de Symmers estava presente.

O aumento do peso do fígado e do baço foi verificado por Powers e Cheever¹³ (1972), ao estudar o desenvolvimento do *S. mansoni* em várias linhagens em macacos.

Segundo observações de Magalhães e col.¹⁰ (1975), camundongos infectados com *S. mansoni* das linhagens BH e SJ apresentaram fígado maior em relação aos camundongos não infectados pelo trematódeo.

Conforme verificado por Andrade¹ (1962), a esplenomegalia observada em camundongos esquistossomóticos é consequência da hiperplasia das células do sistema reticuloendotelial, e da congestão venosa que aparece tardiamente e se manifesta pela dilatação dos seios venosos, com hiperplasia e hipertrofia da trama reticular.

Os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6, referentes aos pesos do fígado e do baço dos camundongos infectados, mostram a ocorrência de hepatomegalia e esplenomegalia, incidindo de maneira mais acentuada nos animais infectados com a linhagem BH.

Os mecanismos imunológicos que envolvem a participação das células T estão, de certo modo, relacionados com os pesos do fígado e do baço de camundongos infectados, uma vez que, em camundongos congenitamente atímicos e submetidos à infecção esquistossomótica, os pesos dessas vísceras são menores do que aqueles verificados em camundongos que apresentam timo ou que tiveram o timo reconstituído através de enxerto (Phillips e col.¹¹, 1977).

O ovo do trematódeo desempenha papel fundamental no desenvolvimento da hepatomegalia e da esplenomegalia esquistossomótica; nas infecções unissexuais observa-se apenas discreto aumento do fígado e do baço (Zanotti e col.¹⁷, 1983).

Como é sabido, a esquistossomose hepatoplênica está relacionada com a resposta imunológica granulomatosa, mediada por células T, observada em torno do ovo de *S. mansoni* depositado no fígado. Em consequência das inúmeras reações granulomatosas no fígado, o funcionamento do órgão se altera, ocorrendo o aparecimento de hipertensão portal e surgimento de circulação colateral.

Camundongos destituídos de timo, timectomizados ou tratados com drogas imunossupressoras ou soro antilinfócito (Domingo e col.⁶, 1967; Domingo e Warren^{7,8}, 1968; Byram e Lichtenberg², 1977; Phillips e col.¹², 1980) e infectados com *S. mansoni* apresentam redução no tamanho do granuloma. Segundo Phillips e col.¹¹ (1977), acompanhando o tamanho reduzido do granuloma observado nos animais destituídos de timo, observa-se também diminuição da pressão portal.

Menores valores dos pesos do fígado e do baço foram observados na presente pesquisa, quando os camundongos foram infectados com cercárias de *S. mansoni*, oriundas de moluscos das gerações F₁, F₂ e F₃ (Tabela 5) quando comparados com a geração parental. Pesos menores para as vísceras foram observados em camundongos cuja infecção foi realizada com cercárias oriundas dos moluscos que alcançaram as mais altas taxas de infecção (Tabela 1). Paralelamente, os menores diâmetros médios dos granulomas hepáticos e esplênicos foram observados nos camundongos infectados com cercárias de moluscos das gerações F₂ e F₃ (Zanotti-Magalhães e col.¹⁸, 1993).

DeWitt e Warren⁵ (1959) e Cheever³ (1965) referem que há relação entre a hipertensão portal e o tamanho das reações granulomatosas. Com base nessas observações, é de se supor que os menores pesos do fígado e do baço, no presente trabalho verificados em camundongos infectados com cercárias oriundas de moluscos mais susceptíveis, parecem ser consequência do menor tamanho dos granulomas no parênquima hepático, o que de alguma forma acarretaria uma menor hipertensão portal e, assim, menor congestão venosa.

O peso corporal dos camundongos infectados, quando comparado com o peso dos animais sadios, constitui parâmetro importante no quadro da esquistossomose. Conforme o apresentado na Tabela 4, a infecção esquistossomótica determinou peso corporal menor do que o de camundongos sadios e a susceptibilidade maior do molusco à infecção esquistossomótica acarretou menor crescimento ponderal do hospedeiro definitivo durante a evolução do parasita em seu organismo.

A mortalidade verificada nos animais infectados com *S. mansoni* é sobretudo uma consequência da presença dos ovos do parasita no organismo do hospedeiro (Zanotti e col.¹⁷, 1983).

Não obstante o tamanho da reação granulomatosa estar diminuído, a pressão portal estar reduzida e ser menor o tamanho do fígado e do baço em camundongos destituídos de linfócitos T, lesões hepatocelulares causadas por ação de substâncias emanadas dos ovos e maior susceptibilidade a outros agentes infecciosos podem explicar a menor sobrevida dos animais.

Como reforça a análise estatística (Tabela 3) a maior susceptibilidade de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, corresponde a uma menor sobrevivência dos camundongos infectados. A maior nocividade da infecção esquistossomótica no hospedeiro vertebrado parece ter estreita relação com a reação granulomatosa em seus tecidos, uma vez que a maior mortalidade observada em camundongos corresponde a uma menor reação imune celular em torno do ovo do parasita (Zanotti-Magalhães e col.¹⁸, 1993).

Os resultados obtidos no decorrer do experimento fazem crer que a maior adaptação do parasita no hospedeiro intermediário, traduzida pelas taxas mais altas de susceptibilidade apresentadas pelos moluscos das gerações F₁, F₂, F₃ e F₄ ao *S. mansoni*, pode levar a um comportamento diferente deste mesmo parasita, quando desenvolve seu ciclo biológico no hospedeiro definitivo. Saoud¹⁵ (1966) aventou essa hipótese como plausível para explicar as diferenças de infectividade e patogenicidade de diferentes linhagens de *S. mansoni*.

Referências Bibliográficas

1. ANDRADE, Z. A. Aspectos experimentais da esplenomegalia da esquistossomose. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 4: 249-55, 1962.
2. BYRAM, J. E. & LICHTENBERG, F. V. Altered schistosoma granuloma formation in nude mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26: 944-56, 1977.
3. CHEEVER, A. W. A comparative study of *Schistosoma mansoni* infections in mice, gerbils, multimammate, rats and hamsters. I. The relation of portal hypertension to size of hepatic granuloma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14: 211-26, 1965.
4. CHEEVER, A. W. A quantitative post-mortem study of schistosomiasis in man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 17: 38-64, 1968.

5. De WITT, W. B. & WARREN, K. S. Hepatosplenic schistosomiasis in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 8: 440-6, 1959.
6. DOMINGO, E. O.; COWARD, R. B. T.; WARREN, K. S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. I. Immunossuppressive drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16: 284-92, 1967.
7. DOMINGO, E. O. & WARREN, K. S. Endogenous desensitization: changing host granulomatous response to schistosome eggs at different stages of infection with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Pathol.*, 52: 369-79, 1968.
8. DOMINGO, E. O. & WARREN, K. S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. III. Heterologous anti-lymphocyte serum. *Am. J. Pathol.*, 52: 613-31, 1968.
9. LIMA, J. N. Estudo clínico e terapêutico da esquistossomose mansônica em menores de 15 anos do Vale do Ribeira, SP: comparação de oxamniquine, praziquantel e associação dessas drogas em baixas doses. Campinas, 1991. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP].
10. MAGALHÃES, L. A.; ALCÂNTARA, F. G.; CARVALHO, J. F. Alguns dados referentes ao estudo parasitológico e anatomopatológico de duas linhagens de *Schistosoma mansoni*, Sambon, 1907. *Rev. Saúde Pública*, 9: 1-5, 1975.
11. PHILLIPS, S. M.; DICONZA, J. J.; GOLD, J. A.; REID, W. A. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia granuloma formation and host morbidity. *J. Immunol.*, 118: 594-9, 1977.
12. PHILLIPS, S. M.; REID, W. A.; DOUGHTY, B. L.; BENTLEY, A. G. The immunologic modulation of morbidity in schistosomiasis. Studies in athymic mice and *in vitro* granuloma formation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29: 820-31, 1980.
13. POWERS, K. G. & CHEEVER, A. W. Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the Rhesus monkey. *Bull. World. Health. Organ.*, 46: 295-300, 1972.
14. SANTOS, N. R. Esquistossomose mansônica autóctone no Vale do Médio Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil: contribuição para o estudo da zona endêmica. São Paulo, 1967. [Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da USP].
15. SAOUD, M. F. A. The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. S. Trop. Med. Hyg.*, 60: 585-600, 1966.
16. WARREN, K. S. A comparison of Puerto Rican, Brazilian, Egyptian and Tanzanian strains of *Schistosoma mansoni* in mice: penetration of cercariae, maturation of schistosomes and of liver disease. *Trans. R. S. Trop. Med. Hyg.*, 61: 795-802, 1967.
17. ZANOTTI, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; PIEDRABUENA, A. E. Avaliação da patogenicidade decorrente da infecção pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, agente de infecções unissexuais em *Mus musculus*. *Rev. Saúde Pública*, 17: 394-405, 1983.
18. ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. *Rev. Saúde Pública*, 27: 412-20, 1993.

Abstract

The relationship between the development of hepatomegaly, splenomegaly, body weight and mortality rate and the degree of susceptibility of *Biomphalaria glabrata* and *B. tenagophila* at which infective cercariae developed was studied. The study utilized Swiss mice, SPF, as definitive hosts and populations of snails genetically selected for character susceptibility as intermediate hosts. Low body weight and smaller viscera were observed in infected mice with cercariae originating from snails that showed a high degree of susceptibility. The higher susceptibility of molluscs infected with *S. mansoni* corresponded to a lower survival of the infected mice. These results lead to the conclusion that the higher degree of adaptation of the parasite to its intermediate hosts, evidenced by the high indexes of susceptibility, leads to different behaviour on the part of this parasite in its definitive host.

Biomphalaria, parasitology. *Schistosoma mansoni*, pathogenicity. Hepatomegaly, epidemiology. Splenomegaly, epidemiology.